

Document made available under the Patent Cooperation Treaty (PCT)

International application number: PCT/EP05/002689

International filing date: 14 March 2005 (14.03.2005)

Document type: Certified copy of priority document

Document details: Country/Office: DE
Number: 10 2004 013 847.8
Filing date: 20 March 2004 (20.03.2004)

Date of receipt at the International Bureau: 11 April 2005 (11.04.2005)

Remark: Priority document submitted or transmitted to the International Bureau in compliance with Rule 17.1(a) or (b)



World Intellectual Property Organization (WIPO) - Geneva, Switzerland
Organisation Mondiale de la Propriété Intellectuelle (OMPI) - Genève, Suisse

BUNDESREPUBLIK DEUTSCHLAND**Prioritätsbescheinigung über die Einreichung
einer Patentanmeldung**

Aktenzeichen: 10 2004 013 847.8

Anmeldetag: 20. März 2004

Anmelder/Inhaber: Degussa AG, 40474 Düsseldorf/DE

Bezeichnung: Cyanidtolerante Nitrilhydratasen

IPC: C 12 N 9/88

Die angehefteten Stücke sind eine richtige und genaue Wiedergabe der ursprünglichen Unterlagen dieser Patentanmeldung.

München, den 18. Februar 2005
Deutsches Patent- und Markenamt
Der Präsident
Im Auftrag


Wehner

Cyanidtolerante Nitrilhydratasen

Die Erfindung betrifft cyanidtolerante Nitrilhydratasen aus Pseudomonas putida- und Pseudomonas marginalis- Stämmen, die eine erhöhte Cyanidtoleranz aufweisen und ihre
5 Verwendung zur Herstellung von Amiden aus Nitrilen in Gegenwart von Cyaniden.

Die Umsetzung von α -Hydroxynitrilen (Cyanhydrinen) und α -Aminonitrilen zu den entsprechenden Amiden mittels Nitrilhydratasen eröffnet eine neue Synthesevariante zu α -Hydroxysäuren und α -Aminosäuren, da α -Hydroxy- und α -Aminoamide auf einfache Weise verseift werden können
10 (Process and catalysts for the production of methionine. Ponceblanc, Hervé; Rossi, Jean-Christophe; Laval, Philip; Gros, Georges. (Rhone-Poulenc Animal Nutrition SA, Fr.),
15 (WO 2001060789). Allerdings zerfallen α -Hydroxynitrile und α -Aminonitrile leicht zu Aldehyden und Blausäure bzw. Aldehyden, Blausäure und Ammoniak. Die entstehende Blausäure ist ein starker Inhibitor für fast alle bekannten Nitrilhydratasen, mit Ausnahme der Nitrilhydratase aus
20 Rhodococcus equi XL-1, die bei 20 mM Cyanid den bisher geringsten bekannten Aktivitätsverlust zeigt. (Production of amides from nitriles by Rhodococcus equi cells having a cyanide resistant-nitrile hydratase. Nagasawa, Tohru; Matsuyama, Akinobu. (Daicel Chemical Industries, Ltd.,
25 Japan), (EP 1 266 962 A).

Die geringe Produktivität von ca. 8 g Amid pro g Biotrockenmasse der Ruhezellen, die lange Reaktionszeit von 43 Stunden und die relativ geringe Produktkonzentration von 75 g/L führen zur Suche nach verbesserten Nitrilhydratasen.

30 Das Ziel der hier beschriebenen Erfindung ist deshalb einen Biokatalysator zur Verfügung zu stellen, der nicht diesen Einschränkungen unterliegt. Ausserdem ist eine noch höhere Toleranz des Biokatalysators gegenüber Cyanid vorteilhaft, da α -Hydroxynitrile und α -Aminonitrile zur Gewährleistung

einer schnellen und vollständigen Umsetzung des Aldehyds bevorzugt mit einem 1-3 %-igen Überschuss an Blausäure hergestellt werden, der zum Teil im Produkt verbleibt. Somit können während der Biotransformation

- 5 Cyanidkonzentrationen auftreten, die 20 mM übersteigen. Nebenprodukte und Reagentien wie als Hilfsbasen eingesetzte Amine dürfen die Nitrilhydratase-Aktivität ebenfalls nicht inhibieren.

10 Aufgabe der Erfindung ist es, Nitrilhydratasen bereitzustellen, die gegenüber Cyanidionen bei der Umsetzung von Nitrilen zu Amiden eine erhöhte Stabilität aufweisen.

Gegenstand der Erfindung ist

- 15 1) ein Verfahren zur enzymatischen Herstellung von Amiden aus Nitrilen, das folgende Schritte aufweist:
- a) Umsetzung einer Nitrilgruppen enthaltenden Verbindung mit einem mikrobiellen Enzym, das Nitrilhydratase-Aktivität aufweist und
 - b) Abtrennung des gebildeten Amids, wobei man
 - 20 c) für die Umsetzung ein Enzym einsetzt, dessen Restaktivität nach der Umsetzung von Methacrylnitril in Gegenwart von 20 mM (mM = mmol/l) Cyanidionen bei 20°C nach 30 min. mindestens 90 % der Restaktivität des Enzyms
 - 25 beträgt, das unter ansonsten denselben Bedingungen in Abwesenheit von Cyanidionen eingesetzt wurde,
- 2) ein Verfahren gemäß 1), dadurch gekennzeichnet, dass
- 30 die Restaktivität nach der Umsetzung in Gegenwart von 50 mM Cyanidionen mindestens 60 % beträgt,

3) ein Verfahren gemäß 1) oder 2), dadurch gekennzeichnet, dass man das Enzym produzierende und enthaltende Mikroorganismen oder deren Lysat einsetzt.

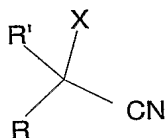
4) ein Verfahren gemäß 3), dadurch gekennzeichnet, dass man ruhende Zelle des Mikroorganismus einsetzt,

5) ein Verfahren gemäß 1) oder 2), dadurch gekennzeichnet, dass man das gereinigte Enzym einsetzt,

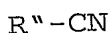
6) ein Verfahren gemäß 1) bis 5), dadurch gekennzeichnet, dass das Enzym aus Mikroorganismen der Gattung *Pseudomonas* stammt,

7) ein Verfahren gemäß 6), dadurch gekennzeichnet, dass das Enzym aus Mikroorganismen der Gattung *Pseudomonas* stammt, hinterlegt unter den Nummern DSM 16275 und DSM 16276,

8) ein Verfahren gemäß einem oder mehreren der Punkte 1) bis 7), dadurch gekennzeichnet, dass man Verbindungen der allgemeinen Formeln



(I)



(II)

einsetzt, in der bedeuten:

X: OH, H, Alkyl mit 1 bis 4 C-Atomen, NH₂

R: H, gesättigter Alkylrest mit 1 bis 12 C-Atomen, verzweigt oder unverzweigt, gegebenenfalls NH₂-substituiert

ungesättigte Alkylreste mit einer Doppelbindung

und 1 bis 12 C-Atomen, verzweigt oder unverzweigt, Cycloalkylgruppen mit 3 bis 6 C-Atomen,
mit Alkylthiogruppen substituierte Alkylenreste, wobei Alkyl hier einem C₁ bis C₃-Rest
und Alkylen einem zweiwertigen C₃ bis C₈-Rest entspricht,

R': H, wenn R kein H bedeutet, Alkyl mit 1 bis 3 C-Atomen,

R'': ein- oder zweikerniger ungesättigter Ring, mit 6 bis 12 C-Atomen, gegebenenfalls substituiert mit einer oder zwei Alkylgruppen (C₁ - C₃), Cl, BR, F substituiert,

einwertiger Alkylnitrilrest mit 1 bis 6 C-Atomen zu den entsprechenden Amiden umgesetzt,

9) ein Verfahren gemäß 8), dadurch gekennzeichnet, dass man eine Verbindung der allgemeinen Formel(I) in Gegenwart von Blausäure oder einem Salz der Blausäure umsetzt,

10) ein Verfahren gemäß 9), dadurch gekennzeichnet, dass man die Umsetzung in Gegenwart von 0,1 mol% Cyanid bis 3 mol% Cyanid bezogen auf das eingesetzte Nitril durchführt, bevorzugt > 2 bis 3 mol%. Dies entspricht bei 1 mol Endkonzentration bei 3 mol% 30 mMol Cyanid,

11) ein Verfahren gemäß einem oder mehreren der Punkte 1) bis 10), dadurch gekennzeichnet, dass man als Nitril Methioninnitril einsetzt,

12) ein Verfahren gemäß einem oder mehreren der Punkte 1) bis 10), dadurch gekennzeichnet, dass man als Nitril 2-Hydroxy-4-methylthiobutyronitril einsetzt.

Bevorzugt setzt man ein Reaktionsgemisch ein, wie man es erhält, wenn man Blausäure, 3-

Methylthiopropionaldehyd in Gegenwart einer Hilfsbase wie z.B. Triethylamin nach dem Stand der Technik umgesetzt.

Es kann ohne Aufreinigung eingesetzt werden.

5 Dies weist auf die zusätzliche Stabilität der erfindungsgemäßen Enzyme gegenüber Aldehyden und Aminen hin.

10 13) Ein Verfahren, bei dem man als Vorstufe für Methacrylamid 2-Hydroxy-2-methylpropionitril, einsetzt.

14) Die Erfindung ist ebenso ausgerichtet auf isolierte und gereinigte Mikroorganismen der Gattung *Pseudomonas*, hinterlegt unter den Nummern DSM 16275 (MA32, *Pseudomonas marginalis*) und DSM 16276 (MA113, *Pseudomonas putida*), und

15 15) Nitrilhydratase, isoliert aus den Stämmen der Gattung *Pseudomonas*, hinterlegt unter den Nummern DSM 16275 und DSM 16276.

20 Die Hinterlegung erfolgte am 09.03.2004 bei der DSMZ, Deutsche Sammlung für Mikroorganismen und Zellkulturen in Braunschweig, nach dem Budapester Vertrag.

Diese Stämme sind geeignet, die erfindungsgemäßen Enzyme zu produzieren.

25 „Isolierte und gereinigte Mikroorganismen“ betrifft Mikroorganismen, die in einer höheren Konzentration als natürlich zu finden vorliegen.

Gegenstand der Erfindung ist ebenso ein Verfahren zur Herstellung einer cyanidtoleranten Nitrilhydratase, bei dem man

- a) einen diese Nitrilhydratase produzierenden Mikroorganismen, insbesondere der Gattung *Pseudomonas marginalis* oder *Pseudomonas putida*, unter Bedingungen fermentiert, dass sich das Enzym in dem
- 5 Mikroorganismus bildet,
- b) frühestens nach dem Durchlaufen der logarithmischen Wachstumsphase die Zellen erntet und
- c) entweder den das Enzym enthaltenden Mikroorganismus als ruhende Zellen, gegebenenfalls nach der Erhöhung
- 10 der Permeabilität der Zellmembran oder
- d) das Lysat der Zellen oder
- e) das aus den Zellen des Mikroorganismus mit bekannten Maßnahmen isolierte Enzym

zur Umwandlung von Nitrilen in Amide einsetzt.

- 15 Das zu verwendende Kulturmedium muss in geeigneter Weise den Ansprüchen der jeweiligen Stämme genügen. Beschreibungen von Kulturmedien verschiedener Mikroorganismen sind im Handbuch "Manual of Methods for General Bacteriology" der American Society for Bacteriology
- 20 (Washington D.C., USA, 1981) enthalten.

Als Kohlenstoffquelle können Zucker und Kohlehydrate wie z.B. Glucose, Saccharose, Lactose, Fructose, Maltose, Melasse, Stärke und Cellulose, Öle und Fette wie z.B. Sojaöl, Sonnenblumenöl, Erdnußöl und Kokosfett, Fettsäuren

25 wie z.B. Palmitinsäure, Stearinsäure und Linolsäure, Alkohole wie z.B. Glycerin und Ethanol und organische Säuren wie z.B. Essigsäure verwendet werden. Diese Stoffe können einzeln oder als Mischung verwendet werden.

Als Stickstoffquelle können vorteilhaft organische Nitrile

30 oder Säureamide wie Acetonitril, Acetamid, Methacrylnitrile, Methacrylamid, Isobutyronitril,

Isobutyramid oder Harnstoff auch in Kombination mit anderen Stickstoffhaltigen Verbindungen wie Peptone, Hefeextrakt, Fleischextrakt, Malzextrakt, Maisquellwasser, Sojabohnenmehl und oder anorganische Verbindungen wie

5 Ammoniumsulfat, Ammoniumchlorid, Ammoniumphosphat, Ammoniumcarbonat und Ammoniumnitrat verwendet werden. Die Stickstoffquellen können einzeln oder als Mischung verwendet werden.

10 Als Phosphorquelle können Phosphorsäure, Kaliumdihydrogenphosphat oder Dikaliumhydrogenphosphat oder die entsprechenden Natrium-haltigen Salze verwendet werden. Das Kulturmedium muss weiterhin Salze von Metallen enthalten wie z.B. Magnesiumsulfat oder Eisensulfat, die für das Wachstum notwendig sind. Schließlich können essentielle

15 Wuchsstoffe wie Aminosäuren und Vitamine zusätzlich zu den oben genannten Stoffen eingesetzt werden. Die genannten Einsatzstoffe können zur Kultur in Form eines einmaligen Ansatzes hinzugegeben oder in geeigneter Weise während der Kultivierung zugefüttert werden.

20 Zur pH-Kontrolle der Kultur werden basische Verbindungen wie Natriumhydroxid, Kaliumhydroxid, Ammoniak bzw. Ammoniakwasser oder saure Verbindungen wie Phosphorsäure oder Schwefelsäure in geeigneter Weise eingesetzt. Zur Kontrolle der Schaumentwicklung können Antischaummittel wie

25 z.B. Fettsäurepolyglykolester eingesetzt werden. Um aerobe Bedingungen aufrechtzuerhalten, werden Sauerstoff oder Sauerstoff haltige Gasmischungen wie z.B. Luft in die Kultur eingetragen. Die Temperatur der Kultur liegt normalerweise bei 10°C bis 40°C und vorzugsweise bei 10°C

30 bis 30°C. Die Kultur wird solange fortgesetzt, bis sie die logarithmische Wachstumsphase durchschritten hat. Dieses Ziel wird normalerweise innerhalb von 10 Stunden bis 70 Stunden erreicht. Im Anschluss daran werden die Zellen bevorzugt geerntet, gewaschen und in einem Puffer als

35 Suspension bei einem pH-Wert von 6-9, insbesondere von 6,8

bis 7,9 aufgenommen. Die Zellkonzentration beläuft sich auf 1-25%, insbesondere 1,5 bis 15% (Feuchtgewicht/v). Die Permeabilität kann mit physikalischen oder chemischen Methoden so, z. B. mit Toluol wie bei Wilms et al., J. Biotechnol., Vol. 86 (2001), 19-30 beschrieben, erhöht werden, dass das umzuwandelnde Nitril die Zellwand durchdringen und das Amid austreten kann.

Folgende Nitrile werden bevorzugt umgesetzt:

gesättigte Mononitrile:

10 Acetonitril, Propionitril, Butyronitril, Isobutyronitril, Valeronitril, Isovaleronitril, Carpronitril

gesättigte Dinitrile:

Malonitril, Succinonitril, Glutarnitril, Adiponitril

aromatische unsubstituierte und substituierte Mono- und
15 Dinitrile:

Benzonitril, 2,6-DifluorBenzonitril, Phthalonitril, Isophthalonitril, Terephthalonitril,

α -Aminonitrile:

20 α -Aminopropionitril, α -Aminomethylthiobutyronitril, α -Aminobutyronitril, Aminoacetonitril, alle von natürlichen Aminosäuren abgeleitete Nitrile, α -Amino-3,3-dimethylpropionitril α -Amino-2,3-dimethylpropionitril

Nitrile mit Carboxyl-Gruppen:

25 Cyanessigsäure

β -Aminonitrile:

Amino-3-propionitril

ungesättigte Nitrile:

Acrylnitril, Methacrylonitril, Allylcyanid, Crotononitril

α -Hydroxynitrile:

α -Hydroxy-n-propionitril, α -Hydroxy-n-butyronitril, α -Hydroxy-isobutyronitril, α -Hydroxy-n-hexyronitril, α -Hydroxy-n-heptyronitril, α -hydroxy-n-octyronitril, α, γ -
5 Dihydroxy- β, β -dimethylbutyronitril, Acroleincyanohydrin, Methacrylaldehyd cyanohydrin, 3-Chlorolactonitril, 4-Methylthio- α -hydroxybutyronitril und α -Hydroxy- α -phenylpropionyl.

Die Konzentration der umzusetzenden Nitrile in der
10 Reaktionslösung ist nicht auf bestimmte Bereiche begrenzt.

Um eine Inhibierung der Enzymaktivität durch das Substrat zu vermeiden, hält man die Konzentration des Nitrils im allgemeinen auf 0,02 bis 10 w/w%, insbesondere 0,1 bis 2 w/w%, bezogen auf die Menge des Biokatalysators als
15 getrocknete Zellmasse. Das Substrat kann zu Beginn der Umsetzung insgesamt oder im Verlauf der Umsetzung kontinuierlich oder diskontinuierlich zugesetzt werden.

Die Bestimmung des Trockengewichts erfolgt mit dem Moisture Analyser MA 45 (Sartorius).

20 Wenn die Löslichkeit der Nitrilverbindung in dem wässrigen Reaktionssystem zu gering ist, kann ein Lösungsvermittler zugesetzt werden.

Die Reaktion kann aber alternativ auch in einem Zweiphasensystem Wasser/organische Lösungsmittel
25 durchgeführt werden.

Bei der Verwendung von Zellen des Mikroorganismus als enzymatisch aktivem Material, ist die Menge der eingesetzten Zellen im Verhältnis zur Substratmenge bevorzugt 0,02 bis 10 w/w% als getrocknete Zellmasse.

30 Es ist auch möglich, das isolierte Enzym nach allgemein bekannten Techniken zu immobilisieren und in dieser Form dann einzusetzen.

Die Reaktion wird im allgemeinen bei Temperaturen von -5°C bis 50°C , insbesondere 0°C bis 30°C , und einer Zeitdauer von 0,1 bis 100 Stunden durchgeführt.

- 5 Der einzuhaltende pH-Wert des Reaktionsgemisches ist so lange nicht auf bestimmte Werte begrenzt, wie die enzymatische Aktivität nicht beeinträchtigt wird. Nach der Umsetzung kann das gebildete Amid aus der Reaktionslösung wie bekannt abgetrennt und gereinigt werden.

Beispiele

10 Beispiel 1

Anzuchtbedingungen

- 15 Die Vorkulturen wurden innerhalb von 24 h unter Schütteln bei 30°C in einem Volumen von 5 ml in Glasröhrchen angezogen. Mit 1 ml der Vorkultur wurden 100 ml der Hautkultur angeimpft und 42 h bei 25°C in einem Erlenmeyerkolben mit einem Gesamtvolumen von 1000 ml geschüttelt.

Medium für die Vorkultur (pH 7,0)	
K_2HPO_4	7 g
KH_2PO_4	3 g
Na-citrat	0,5 g
Glycerin	2 g
$\text{FeSO}_4 \cdot 7 \text{ H}_2\text{O}$	0,004 g
$\text{MgSO}_4 \cdot 7 \text{ H}_2\text{O}$	0.1 g
Acetamid	2 g
Spurensalzlösung	0,1 ml
Demineralisiertes Wasser	Ad. 1000 ml

Medium für die Hauptkultur (pH 7,0)	
K ₂ HPO ₄	7 g
KH ₂ PO ₄	3 g
Natriumcitrat	0,5 g
Glycerin	2 g
FeSO ₄ * 7 H ₂ O	0,004 g
MgSO ₄ * 7 H ₂ O	0.1 g
Acetamid	10 g
Spurensalzlösung	0,1 ml
Demineralisiertes Wasser	Ad. 1000 ml

Spurensalzlösung	
EDTA, Na ₂ * 2 H ₂ O	158 mg
Na ₂ MoO ₄ * 2 H ₂ O	4,7 mg
ZnSO ₄ * 7 H ₂ O	70 mg
MnSO ₄ * 4 H ₂ O	18 mg
FeSO ₄ * 7 H ₂ O	16 mg
CuSO ₄ * 5 H ₂ O	4,7 mg
CoSO ₄ * 6 H ₂ O	5,2 mg
Demineralisiertes Wasser	Ad. 1000 ml

Beispiel 2

Isolierung und Identifizierung der Mikroorganismen

Die beiden Stämme MA32 und MA113 wurden durch Bestimmung der Nitrilhydratase-Aktivität der Ruhezellen in Gegenwart
5 von 2 mM Kaliumcyanid selektiert.

Eigenschaften von MA32:

	Zellform	Stäbchen
	Breite	0,6 - 0,8 μm
	Länge	1,5 - 3,0 μm
10	Beweglichkeit	+
	Geißeln	polar > 1
	Gram-Reaktion	-
15	Lyse durch 3% KOH	+
	Aminopeptidase (Cerny)	+
	Oxidase	+
	Katalase	+
20	Wachstum bei 41°C	-
	Substratverwertung	
	Adipat	-
	Citrat	+
25	Malat	+
	Phenylacetat	-
	D-Glucose	+
	Maltose	-
	Mannitol	+
30	Arabinose	+
	Mannose	+
	Trehalose	+
	Sorbitol	+
	Erythrol	+
35	Citraconat	+
	Inositol	+
	ADH	+
	Urease	-
40	Hydrolyse von Gelatine	+
	Hydrolyse von Esculin	+

	Levan aus Saccharose	+
	Denitrification	+
5	Lecithinase	+
	Fluoreszens	+
	Pyocyanin	-
10	Das Profil der zellulären Fettsäuren ist typisch für die Gruppe I der Pseudomonaden	
	Die Analyse eines 484 bp langen Abschnitts der 16S rRNA ergab eine 100%-ige Übereinstimmung mit der Sequenz von <i>Pseudomonas marginalis</i>	
15	Unter Berücksichtigung aller Daten konnte MA32 als <i>Pseudomonas marginalis</i> identifiziert werden.	
20	Eigenschaften von MA113:	
	Zellform	Stäbchen
	Breite	0,6 - 0,8 µm
	Länge	1,5 - 3,0 µm
25	Beweglichkeit	+
	Geißeln	polar > 1
	Gram-Reaktion	-
	Lyse durch 3% KOH	+
30	Aminopeptidase (Cerny)	+
	Oxidase	+
	Katalase	+
	Wachstum bei 41°C	-
35	Substratverwertung	
	Adipat	-
	Citrat	+
	Malat	+
40	Phenylacetat	+
	D-Glucose	+
	Maltose	-
	Mannitol	-
	Arabinose	-
45	Mannose	-
	Trehalose	-
	Inositol	-

	β -Alanin	+
	α -Ketoglutarat	+
	Benzylamin	+
	Hippurat	+
5	Azelat	+
	D-Mandelat	+
	ADH	+
	Urease	-
10	Hydrolyse von Gelatine	-
	Hydrolyse von Esculin	-
	Levan aus Saccharose	-
15	Denitrification	-
	Lecithinase	-
20	Fluoreszens	+
	Pyocyanin	-

Das Profil der zellulären Fettsäuren ist typisch für die Gruppe I der Pseudomonaden

25 Die Analyse eines 476 bp langen Abschnitts der 16S rRNA ergab eine 100%-ige Übereinstimmung mit der Sequenz von *Pseudomonas putida*

30 Unter Berücksichtigung aller Daten konnte MA32 als *Pseudomonas putida* identifiziert werden.

Beispiel 3

Bestimmung der enzymatischen Aktivität

35 Die Zellen wurden wie in Beispiel 1 beschrieben angezogen, durch Zentrifugation vom Kulturmedium abgetrennt und im Standardpuffer (50 mM Kaliumphosphatpuffer pH 7,5) resuspendiert. 50 μ l dieser Zellsuspension wurden zu 700 μ l des Standardpuffers gegeben und zum Starten der Reaktion
40 mit 250 μ l einer 200 mM Lösung des Nitrils in Standardpuffer versetzt. Die Konzentration der Zellen in der Zellsuspension war hierbei so bemessen, daß das Nitril

nach 10 min bei 20°C zu 5-30 % umgesetzt war. Nach 10 min bei 20°C wurde die Reaktion durch Zugabe von 20 µl halbkonzentrierter Phosphorsäure abgestoppt und die Zellen wurden durch Zentrifugation abgetrennt.

HPLC-Analytik	
Säule	Intersil ODS-3V (GL Sciences Inc.)
Mobile Phase	Gemisch aus 10 mM Kaliumphosphatpuffer pH 2,3 und Acetonitril im Verhältnis 85:15 für Methioninnitril, MHA-Nitril und Acetoncyanhydrin bzw. 99:1 für alle anderen Substrate
Flußrate	1 ml/min
Detektion	UV bei 200 nm

- 5 Die Aktivität von einem U ist definiert als die Menge an Enzym, die 1 µmol Methacrylnitril in einer Minute zum Amid umsetzt. Entstand neben dem Amid auch die Säure, wurde ein U definiert als die Menge an Enzym, die 1 µmol Methacrylnitril in einer Minute zu Amid und Säure umsetzt.
- 10 In Abbildung 1 und Abbildung 2 wird die relative Aktivität der Stämme MA32 und MA113 dargestellt.

Beispiel 4

Einfluß von Cyanid auf die Aktivität der Nitrilhydratase

- 50 µl einer analog zu Beispiel 3 hergestellten Zellsuspension wurden zu 700 µl des Standardpuffers gegeben, der 0; 21,4; 53,6 und 107,1 mM Kaliumcyanid enthielt (Endkonzentration 0, 20, 50, 100 mM Cyanid. Zum starten der Reaktion wurden 200 µl einer 200 mM Lösung des Nitrils im Standardpuffer zugesetzt, der jeweils die selbe Cyanidkonzentration aufwies wie die übrige Reaktionslösung.
- 20 Die Konzentration der Zellen in der Zellsuspension war hierbei so bemessen, daß das Nitril im Ansatz ohne Cyanid nach 10 min bei 20°C zu 16 % umgesetzt war. Nach 10 min bei 20°C wurde die Reaktion durch Zugabe von 20 µl

halbkonzentrierter Phosphorsäure abgestoppt und der Umsatz wurde analog zu Beispiel 2 bestimmt.

In Abbildung 3 und Abbildung 4 werden die relativen Aktivitäten für die Umsetzung von Methacrylnitril in
5 Abhängigkeit von der Cyanidkonzentration wiedergegeben.

Beispiel 5

Umsetzung von Acetoncyanhydrin mit *Pseudomonas marginalis* MA32 und *Pseudomonas putida* MA113 Ruhezellen

10 *Pseudomonas marginalis* MA32 und *Pseudomonas putida* MA113 Zellen wurden wie in Beispiel 1 beschrieben angezogen und abzentrifugiert. Eine solche Menge der Zellen, die 1,16 g Biotrockenmasse enthielt, wurde mit 50 mM Kaliumphosphatpuffer pH 8,0 auf ein Endvolumen von 50 ml verdünnt. Zusätzlich wurden dem Reaktionsgemisch 0,02 mM 2-
15 Methyl-1-propanboronsäure zugesetzt. Frisch destilliertes Acetoncyanhydrin wurde bei 4°C unter heftigem Rühren kontinuierlich mit einer solchen Rate zugegeben, daß die Konzentration während der Reaktion 5 g/L zu keinem Zeitpunkt überschritt. Der pH wurde konstant bei 7,5
20 gehalten. Die Reaktionsverfolgung wurde mittels HPLC wie in Beispiel 3 beschrieben durchgeführt. Nach 140 min waren 10,0 g des Nitrils vollständig zu 10,7 g Amid und 1,4 g Säure umgesetzt worden.

In Abbildung 5 und Abbildung 6 wird der mit den Stämmen
25 MA113 und MA31 erzielte zeitliche Reaktionsablauf dargestellt.

Beispiel 6

Umsetzung von rohem MHA-Nitril mit *Pseudomonas marginalis* MA32 Ruhezellen

30 *Pseudomonas marginalis* MA32 Zellen wurden wie in Beispiel 1 beschrieben angezogen und abzentrifugiert. Eine solche

Menge der Zellen, die 0,34 g Biotrockenmasse enthielt, wurde mit 50 mM Kaliumphosphatpuffer pH 8,0 auf ein Endvolumen von 70 ml verdünnt. Zusätzlich wurden dem Reaktionsgemisch 0,02 mM 2-Methyl-1-propanboronsäure zugesetzt. Das rohe MHA-Nitril wurde bei 4°C unter heftigem Rühren kontinuierlich mit einer solchen Rate zugegeben, daß die Konzentration während der Reaktion 10 g/L zu keinem Zeitpunkt überschritt. Der pH wurde konstant bei 8,0 gehalten. Die Reaktionsverfolgung wurde mittels HPLC wie in Beispiel 2 beschrieben durchgeführt. Nach 510 min waren 10,05 g des Nitrils vollständig zu 11,13 g Amid und 0,31 g Säure umgesetzt worden. Das entspricht einer Endkonzentration von 139 g Amid pro Liter.

Das MHA-Nitril war direkt aus 3-Methylthiopropionaldehyd und einem leichten Überschuss an Blausäure hergestellt worden. Eine 50 mM Lösung dieses MHA-Nitrils in Wasser enthielt 0,5 mM Cyanid (Spektroquant®, Merck).

Patentansprüche

1. Verfahren zur enzymatischen Herstellung von Amiden aus Nitrilen, das folgende Schritte aufweist:

- 5 a) Umsetzung einer Nitrilgruppen enthaltenden Verbindung mit einem mikrobiellen Enzym, das Nitrilhydratase-Aktivität aufweist und
- b) Abtrennung des gebildeten Amids, wobei man
- 10 c) für die Umsetzung ein Enzym einsetzt, dessen Restaktivität nach der Umsetzung von Methacrylnitril in Gegenwart von 20 mM Cyanidionen bei 20°C nach 30 min. mindestens 90 % der Restaktivität des Enzyms beträgt, das unter ansonsten denselben Bedingungen in Abwesenheit von Cyanidionen eingesetzt wurde.

15 2) Verfahren gemäß Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, dass die Restaktivität nach der Umsetzung in Gegenwart von 50 mM Cyanidionen mindestens 60 % beträgt.

3) Verfahren gemäß den Ansprüchen 1 oder 2, dadurch gekennzeichnet, dass man das Enzym produzierende und enthaltende Mikroorganismen oder deren Lysat einsetzt.

20 4) Verfahren gemäß Anspruch 3, dadurch gekennzeichnet, dass man ruhende Zelle des Mikroorganismus einsetzt.

5) Verfahren gemäß den Ansprüchen 1 oder 2, dadurch gekennzeichnet, dass man das gereinigte Enzym einsetzt.

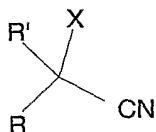
25 6) Verfahren gemäß einem oder mehreren der Ansprüche 1 bis 5, dadurch gekennzeichnet, dass das Enzym aus Mikroorganismen der Gattung Pseudomonas stammt.

7) Verfahren gemäß Anspruch 6, dadurch gekennzeichnet, dass das Enzym aus Mikroorganismen der Gattung

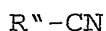
30

Pseudomonas stammt, hinterlegt unter der Nummer
DSM 16275 und DSM 16276.

- 8) Verfahren gemäß einem oder mehreren der Ansprüche 1
bis 7, dadurch gekennzeichnet, dass man Verbindungen
5 der allgemeinen Formel



(I)



(II)

10 einsetzt, in der bedeuten:

X: OH, H, Alkyl, NH₂;

R: H, gesättigter Alkylrest mit 1 bis 12 C-Atomen,
verzweigt oder unverzweigt, gegebenenfalls NH₂-
substituiert,

15 ungesättigte Alkylreste mit einer Doppelbindung
und 1 bis 12 C-Atomen, verzweigt oder
unverzweigt, Cycloalkylgruppen mit 3 bis 6 C-
Atomen,

mit Alkylthiogruppen substituierte

20 Alkylreste, wobei Alkyl hier einem C₁ bis C₃-
Rest

und Alkylen einem zweiwertigen C₃ bis C₈-Rest
entspricht,

R': H, Alkyl mit 1 bis 3 C-Atomen,

25 R'': ein- oder zweikerniger ungesättigter Ring, mit 6
bis 12 C-Atomen, gegebenenfalls mit einer oder
zwei Alkylgruppen (C₁ - C₃), Cl, Br, F.

Alkylnitrilrest mit 1 bis 6 C-Atomen

zu den entsprechenden Amiden umsetzt.

- 9) Verfahren gemäß Anspruch 8, dadurch gekennzeichnet, dass man eine Verbindung der allgemeinen Formel (I) in Gegenwart von Blausäure oder einem Salz der Blausäure umsetzt.
- 5 10) Verfahren gemäß Anspruch 9, dadurch gekennzeichnet, dass man die Umsetzung in Gegenwart einer Anfangskonzentration von mehr als 0,5 mol% Cyanid bis 3 mol% Cyanid, bezogen auf das eingesetzte Nitril, durchführt.
- 10 11) Verfahren gemäß einem oder mehreren der Ansprüche 1 bis 10, dadurch gekennzeichnet, dass man als Nitril 2-Amino-4-methylthiobutyronitril einsetzt.
- 12) Verfahren gemäß einem oder mehreren der Ansprüche 1 bis 10, dadurch gekennzeichnet, dass man als Nitril 2-Hydroxy-4-methylthiobutyronitril einsetzt,
15 gegebenenfalls enthalten in der Reaktionsmischung aus der Herstellung dieses Nitrils.
- 13) Verfahren gemäß einem oder mehreren der Ansprüche 1 bis 10, dadurch gekennzeichnet, dass man als Nitril 2-Hydroxy-2-methylpropionitril einsetzt.
20
- 14) Mikroorganismen der Gattung *Pseudomonas*, hinterlegt unter den Nummern DSM 16275 und DSM 16276
- 15) Nitrilhydratase, isoliert aus den Stämmen der Gattung *Pseudomonas*, hinterlegt unter den Nummern DSM 16275 und DSM 16276.
25

Zusammenfassung

Die Erfindung betrifft cyanidtolerante Nitrilhydratasen aus
Pseudomonas putida-Stämmen, die eine erhöhte Cyanidtoleranz
aufweisen und ihre Verwendung zur Herstellung von Amiden
5 aus Nitrilen in Gegenwart von Cyaniden.

Abbildung 1

MA32

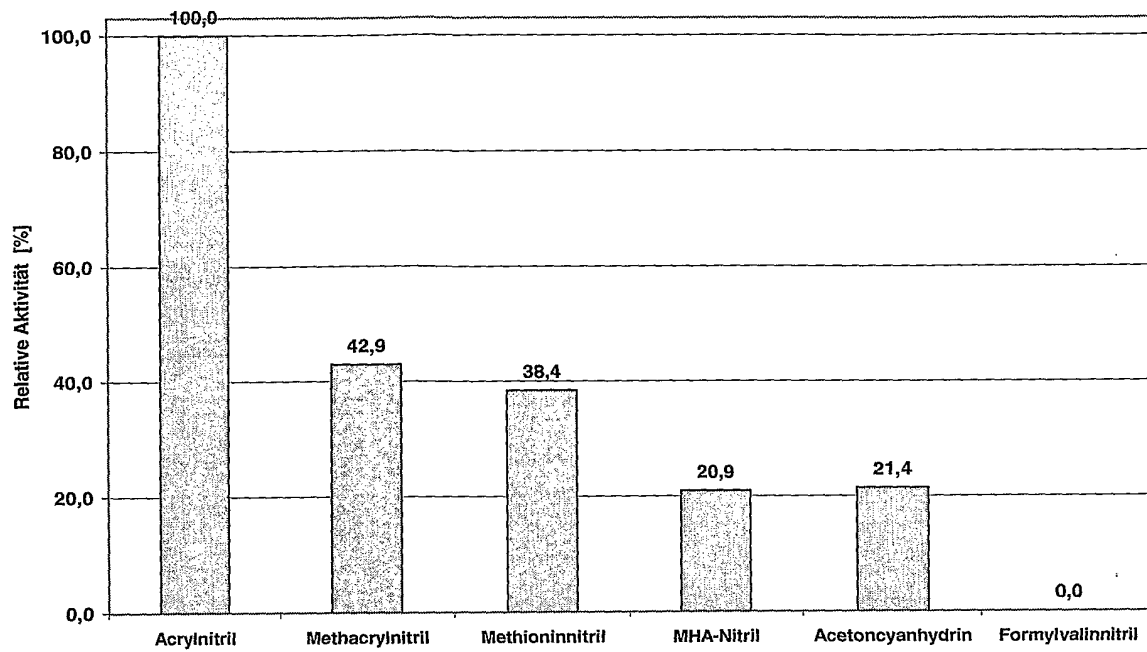


Abbildung 2

MA113

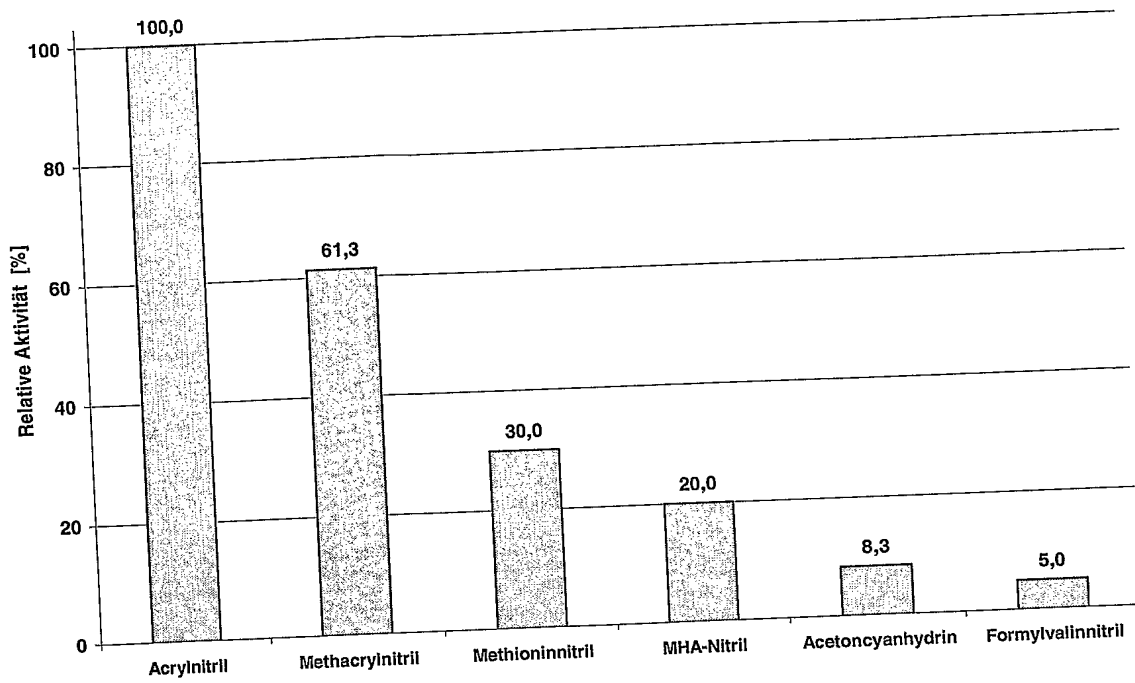


Abbildung 3

MA113

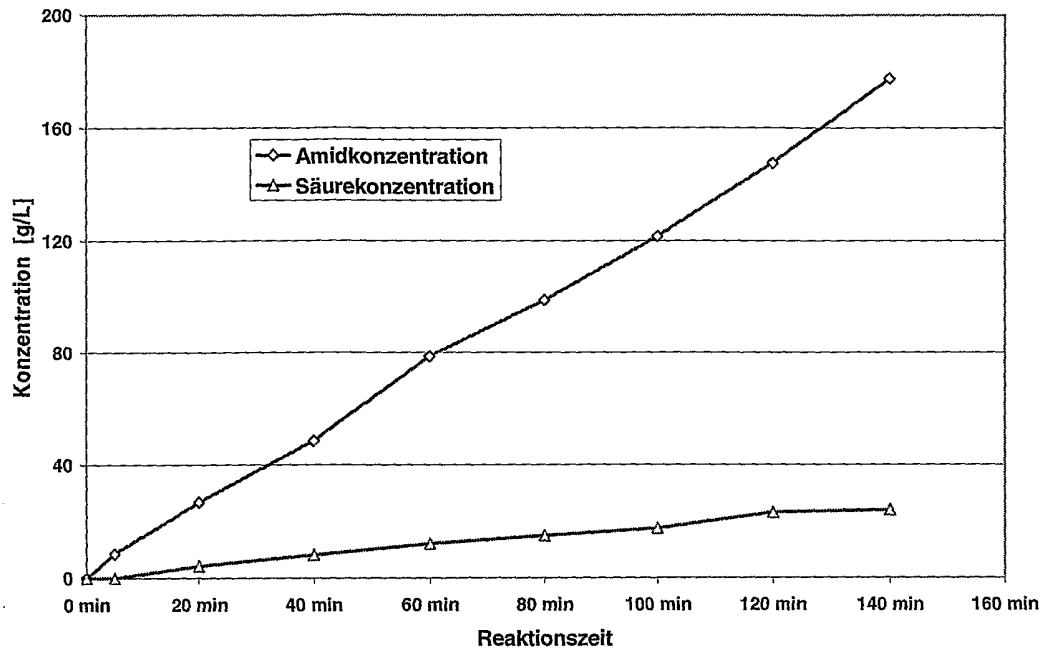


Abbildung 4

MA31

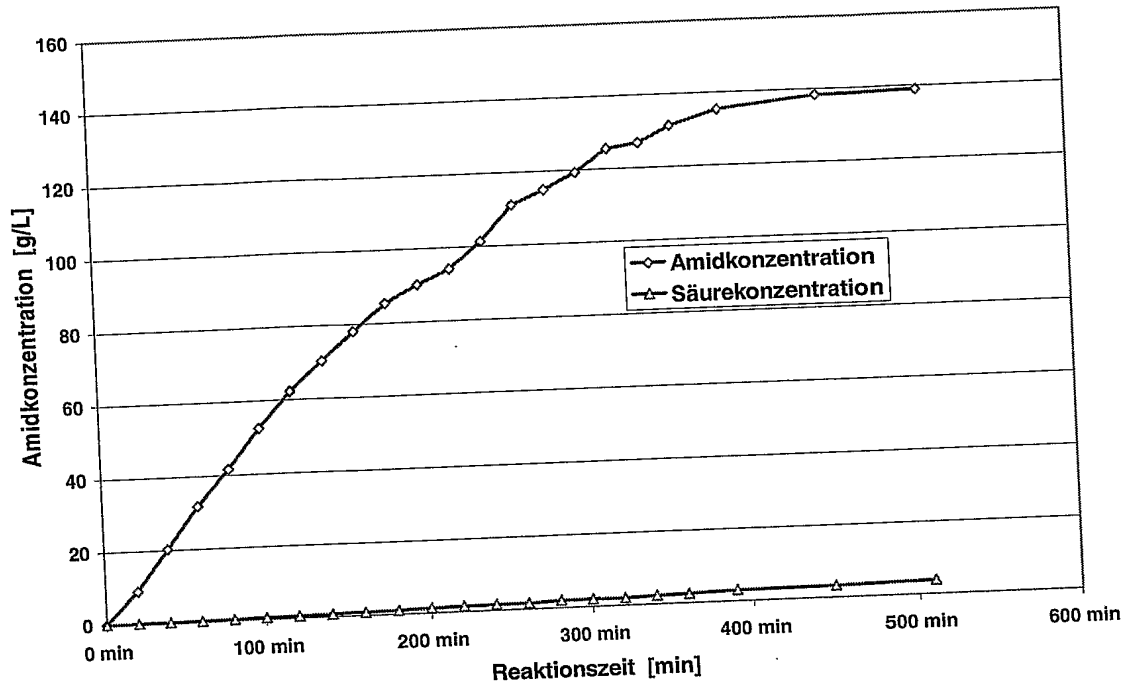


Abbildung 5

MA31

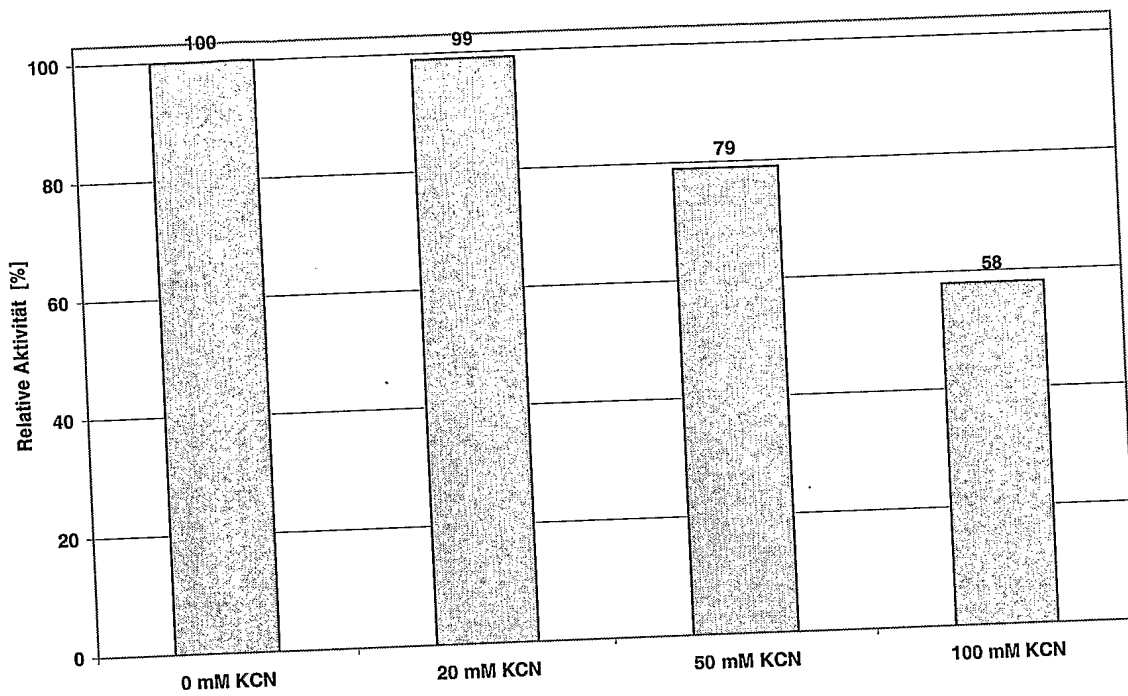


Abbildung 6

MA113

